

山羊 *c-Myc* 原癌基因原核表达和多克隆抗体的制备

张 昫¹, 刘 平¹, 韦友传¹, 李恭贺¹, 辛桂瑜¹, 王丽霞¹, 卢晟盛^{1,2}, 张 明^{1,2},
卢克焕^{1,2}, 郑喜邦^{1*}

(1. 广西大学动物科技学院, 南宁 530005; 2. 广西亚热带生物资源保护与利用重点实验室, 南宁 530005)

摘 要: *c-Myc* 原癌基因与胚胎干细胞(ES 细胞)和诱导的多能性干细胞(iPS 细胞)生物学特性密切相关, 因此制备其相应的多克隆抗体尤为必要。本研究以 pMD18T-Myc 质粒为模版, PCR 扩增 *c-Myc* 片段, 然后将其亚克隆到 pSE380 表达载体上, 获得 pSE380-Myc 重组质粒。该质粒转化工程菌 BL21(DE3), IPTG 诱导表达 His-Myc 融合蛋白, 随后用 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 加以验证。在变性条件下用 Ni-NTA argrose 介质分离纯化 His-Myc 融合蛋白, 并以此为抗原免疫新西兰大白兔。经过 4 次免疫, 采集血液、分离血清, 用 Western blot 检测抗体特异性。结果表明: (1) pSE380-Myc 重组质粒在工程菌 BL21(DE3) 得到了高效表达; (2) 得到了高纯度高含量的 His-Myc 融合蛋白; (3) 经 Western blot 检测发现, *c-Myc* 多克隆抗体与 His-Myc 融合蛋白能够特异性结合。本研究获得的特异性山羊 *c-Myc* 多克隆抗体, 为进一步研究山羊 ES 细胞和 iPS 细胞的自我更新机制奠定了基础。

关键词: 山羊; *c-Myc* 基因; 蛋白纯化; 多克隆抗体

中图分类号: S827; Q786

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)06-0867-05

Prokaryotic Expression of *c-Myc* Protooncogene and Preparation of Polyclonal Anti-*c-Myc* Antibody in *Capra Hircus*

ZHANG Yun¹, LIU Ping¹, WEI You-chuan¹, LI Gong-he¹, XIN Gui-yu¹, WANG Li-xia¹,
LU Sheng-sheng^{1,2}, ZHANG Ming^{1,2}, LU Ke-huan^{1,2}, ZHENG Xi-bang^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bio-resource Conservation and Utilization, Nanning 530005, China)

Abstract: It is necessary to prepare polyclonal antibody of *c-Myc* in *Capra Hircus* since *c-Myc* protooncogene plays an important role in maintaining biological characteristics of embryonic stem cells (ES cells) and inducing pluripotent stem cells (iPS cells). The plasmid pMD18T-Myc was used as template to amplify *c-Myc* fragment, which was subcloned into vector pSE380 to construct recombinant plasmid pSE380-Myc. The plasmid was then transformed into *E. coli* BL21 (DE3), and His-Myc fusion protein was expressed with induction of IPTG, which was subsequently verified by SDS-PAGE and Western blot assay. Purified with Ni-NTA argrose under denaturing condition, His-Myc fusion protein was applied as antigen to immunize New Zealand White rabbits, whose blood was collected, serum (polyclonal anti-*c-Myc* antibody) was isolated after 4 times of immunization, and its specificity was detected with Western blot. The results showed that: (1) The recombinant plasmid pSE380-Myc was efficiently expressed in *E. coli* BL21

收稿日期: 2011-09-12

基金项目: 广西自然科学基金项目(桂科自 0991043); 广西亚热带生物资源保护与利用重点实验室开放课题(SB09); 广西大学基金项目(X081102)

作者简介: 张 昫(1984-), 男, 湖南常德人, 硕士, 主要从事动物疾病分子生物学研究, E-mail: 412203941@qq.com; 刘 平(1982-), 男, 湖南怀化人, 博士, 主要从事动物疾病分子生物学研究, E-mail: lpzl82@163.com。二者并列为一作者

* 通讯作者: 郑喜邦, E-mail: zhixibang2005@126.com

(DE3); (2) His-Myc fusion protein with higher purity was obtained; (3) Western blot analysis illustrated that the polyclonal anti-c-Myc antibody could specifically respond to His-Myc fusion protein. In conclusion, the polyclonal anti-c-Myc antibody obtained in the present study will lay a foundation for the research of self-renewing mechanism of ES cells and iPS cells in *Capra Hircus*.

Key words: *Capra Hircus*; *c-Myc* gene; protein purification; polyclonal antibody

c-Myc 最初是作为一个原致癌基因被发现的,活跃于很多人类肿瘤中,但它也是一种转录因子,是正常细胞生长和增殖所必需的。研究发现 *c-Myc* 基因扩增阳性率在乳腺癌组织中达 25%、膀胱癌组织中达 43.75%^[1];胃癌组织中 *c-Myc* 蛋白表达率达 36%^[2]。研究表明,*c-Myc* 在肝癌发展中起着重要的促进作用^[3]。因 *c-Myc* 蛋白质的羧基端含核酸靶序列,氨基端富含谷氨酰胺和脯氨酸,为肿瘤转化所必需^[4]。在 *c-Myc* 过表达的转基因鼠中,其能诱导产生恶性 T 细胞淋巴瘤和急性髓性白血病,当抑制其表达后可产生明显的抗肿瘤作用^[5]。因此,抑制 *c-Myc* 基因表达对于肿瘤治疗应该有效,*c-Myc* 有可能成为基因治疗的有效靶点。敲除 *c-Myc* 基因的小鼠胚胎发育到 9.5~10.5 d 停止正常发育,说明 *c-Myc* 在正常哺乳动物生长发育中起着至关重要的作用^[6]。*c-Myc* 能够促进小鼠干细胞和祖细胞自我更新和分化,维持胚胎干细胞的特性^[7-8]。Takahashi 等应用反转录病毒载体将 Oct4、Sox2、*c-Myc* 和 Klf4 4 个重编程因子(Reprogramming factors, RFs)共同转入小鼠/人成纤维细胞,产生了诱导的多能性干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPSCs)^[9-10]。此项原创性研究为干细胞研究开辟了一条新途径。应用类似的研究方法,Liu 等获得了猕猴的 iPSCs^[11];Wu 等^[12-13]先后获得了猪的 iPSCs;Honda 等^[14]获得了兔的 iPSCs;Bao 等最近又获得了绵羊的 iPSCs^[15]。上述研究结果有力地佐证了 *c-Myc* 在维持干细胞多能性方面所发挥的重要作用。

家畜多能性干细胞的研究离不开多能性转录因子抗体。然而,目前市售的这类多能性转录因子抗体均来自人和小鼠,将其应用于家畜多能性干细胞的研究存在特异性差的问题,因此制备家畜的多能性转录因子抗体显得十分必要。本研究拟在原有的研究基础上,通过对载体的选择,纯化方法的改进,得到高纯度的山羊 His-Myc 融合蛋白,制备特异性 *c-Myc* 多克隆抗体,为山羊 ES 细胞和 iPS 细胞自我更新机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 质粒 pSE380、pMD18T-Myc、感受态大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 、BL21 为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和药品 T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nco* I 和 *Hind* III、IPTG、预染蛋白 marker 均购自 Fermentas 公司(立陶宛);DNA marker 购自 TaKaRa 公司(日本);引物合成及 DNA 序列测定均由上海生工生物工程有限公司完成;Ni-NTA agarose 购自 Qiagen 公司(德国);质粒小提试剂盒、鼠源 His 标签抗体、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG、化学发光剂均购自 Tiangen 公司(北京);胶回收试剂盒购自 Omega 公司(美国);X 光胶片显影粉与定影粉由石家庄市化工十厂提供;新西兰大白兔由广西大学实验基地提供。

1.2 方法

1.2.1 *c-Myc* 基因原核表达载体构建和鉴定 根据 pMD18-T-Myc 测序所得的编码序列^[16],经 Primer 5.0 软件分析,设计扩增山羊 *c-Myc* 的上游引物:5'-CATG C C A T G G T T C A C C A C C A T C A C C A T - C A T A T G C C C C T C A A C G T C A G C T T C G C C - 3' 及下游引物:5'-C C C A A G C T T T T A G G C G C A A G A G T T C C G - T A T C - 3'。上游引物中引入 *Nco* I 酶切位点和 6 \times His 标签序列,下游引物中引入 *Hind* III 的酶切位点(下划线部分),预期扩增片段长度为 1 320 bp。以 pMD18-T-Myc 为模板,进行 PCR 扩增,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,切取目的片段,胶回收为 PCR 产物。用 *Nco* I 和 *Hind* III 将表达载体 pSE380 和上述纯化的 PCR 产物分别进行双酶切和胶回收,用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化 DH5 α 感受态细菌,将转化菌液涂布于含 100 mg \cdot L⁻¹ 氨苄青霉素(Amp)LA 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h,挑取阳性

菌落、增菌、抽提质粒和酶切分析鉴定,经鉴定正确的阳性质粒送上海生物工程公司测序。

1.2.2 重组质粒在大肠杆菌 BL21 中诱导表达
经鉴定阅读框架正确的阳性重组质粒 pSE380-Myc 转化大肠杆菌 BL21,涂板,37 °C 培养 16~18 h,挑取新鲜菌落,在含 100 mg · L⁻¹ Amp 的 LB 培养基中 37 °C 振荡培养过夜后,取重组菌按 1:100 体积比接入含 100 mg · L⁻¹ Amp 的 5 mL LB 培养基中,220 r · min⁻¹、37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.4~0.6 时,取出 2 mL 菌液作为空白对照,剩下菌液加入终浓度为 1 mmol · L⁻¹ 的 IPTG 在 37 °C 诱导表达 4 h,收集 2 mL 菌液,制备蛋白样品,进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.3 His-Myc 融合蛋白纯化 将阳性重组菌按 1:50 体积比转接 1 000 mL 含 100 mg · L⁻¹ Amp 的 LB 培养基中,37 °C 培养至 OD₆₀₀ = 0.4~0.8 时,加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mmol · L⁻¹,4 h 后收集菌体。随后的蛋白纯化按照 Qiagen 公司 Ni-NTA argrose 使用说明进行操作^[17],分别收集 50 μL 裂解液上清、沉淀、过柱液、Buffer C 和 Buffer E 洗脱品进行 SDS-PAGE 分析。纯化后蛋白保存于 -80 °C 冰箱待用。

1.2.4 *c-Myc* 原核表达产物及纯化的融合蛋白免疫印迹(Western blot)检测 在取得最佳诱导条件后,取诱导表达产物及纯化的 *c-Myc* 融合蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析。制备 2 块小胶,一块用于考马斯亮蓝染色,另一块用于转膜。以湿转法将蛋白转到 NC(硝酸纤维素)膜上,再用 TBST 配制的 5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜。用 TBST 洗膜 10 min,洗 3 次。加入 His 抗体(1:1 500)室温孵育 1 h 后洗膜。再加入山羊抗鼠 IgG(1:5 000),室温孵育 1 h 后洗膜。洗膜后用化学发光法显色 5 min,用保鲜膜包裹 NC 膜,固定在暗盒内,压 X 光胶片,曝光,显影,定影。参照蛋白 Marker 判定目的蛋白大小。

1.2.5 *c-Myc* 多克隆抗体的制备及其特异性检测

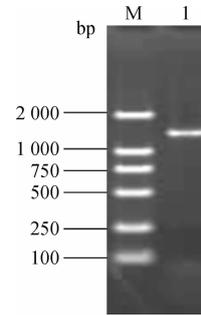
选择 2 只 2 月龄、体质量 2~3 kg 的健康成年公兔,耳静脉采血各 5 mL 分离血清,保存作为阴性对照品。初次免疫,2 mL 弗氏完全佐剂与纯化的重组蛋白(0.5 mg)等体积混合,超声乳化,每只大白兔四肢内侧皮下多点注射。3 周后第 2 次加强免疫,重组蛋白剂量减半,与弗氏不完全佐剂等体积混合形成乳剂在背部皮下多点注射。此后每隔 2 周,分别进行第 3 和第 4 次加强免疫,方法同前。最后

1 次免疫 1 周后,耳动脉采血并分离血清作为一抗,pSE380-Myc 重组质粒诱导表达产物和纯化的 His-Myc 融合蛋白作为抗原,以 Western blot 免疫印迹法检测抗体的特异性,方法同 1.2.4。

2 结果

2.1 *c-Myc* 基因原核表达载体构建

以 pMD18-T-Myc 为模板,进行 PCR 扩增,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,得到了大小约 1 320 bp 的单一一条带,与预期目的片段相符(图 1)。重组质粒经双酶切和 1% 琼脂糖凝胶电泳,也获得同样大小的片段,与预期结果相符(图 2)。鉴定确认的质粒经测序读码框正确,将其命名为 pSE380-Myc。

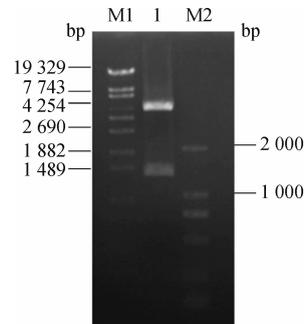


M. DNA 相对分子质量标准; 1. 山羊 *c-Myc* PCR 扩增产物

M. DNA marker DL 2000; 1. PCR products of *Capra Hircus c-Myc*

图 1 *c-Myc* 基因 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *Capra Hircus c-Myc*



M1. λ-EcoT14I digest DNA marker; 1. *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒 pSE380-myc; M2. DNA 相对分子质量标准

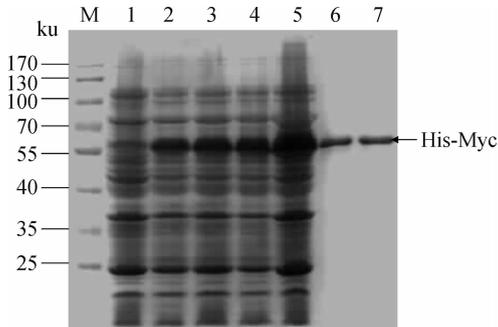
M1. λ-EcoT14I digest DNA marker; 1. pSE380-Myc digested by restrictive enzyme digestion of *Nco* I and *Hind* III; M2. DNA marker DL 2000

图 2 山羊 *c-Myc* 基因原核表达载体构建

Fig. 2 Construction of prokaryotic expression vector of *Capra Hircus c-Myc* gene

2.2 pSE380-Myc 质粒在大肠杆菌中的诱导表达及融合蛋白纯化

pSE380-Myc 质粒转化至大肠杆菌 BL21, 在 37 °C 1 mmol · L⁻¹ IPTG 诱导 4 h 后, 经 SDS-PAGE 分析, 将诱导的与未诱导的重组 BL21 菌液对照, 发现前者的蛋白样品在约 55 ku 处有 1 条特异性条带, 与预期大小相吻合, 而后者的蛋白样品未出现此条带 (图 3)。经 Ni-NTA argrose 纯化的 His-Myc 融合蛋白也在 55 ku 处出现 1 条带, 纯度较高 (图 3)。证明笔者确实获得了 His-Myc 融合蛋白。



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 未诱导的重组 BL21; 2~5. 用 1 mmol · L⁻¹ IPTG 37 °C 诱导的重组 BL21; 6~7. 纯化的 His-Myc 融合蛋白
M. Prestained protein marker; 1. Noninduced recombinant *E. coli* BL21; 2-5. Recombinant *E. coli* BL21 induced by 1 mmol · L⁻¹ IPTG at 37 °C; 6-7. Purified His-Myc fusion protein

图 3 pSE380-Myc 表达产物及 His-Myc 融合蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis for expression products of pSE380-Myc and the purified His-Myc fusion protein

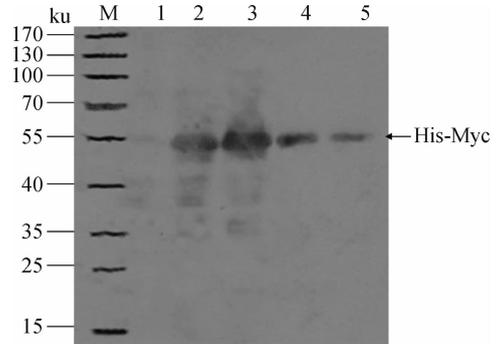
2.3 c-Myc 多克隆抗体特异性检测

以诱导表达产物和纯化的 His-Myc 融合蛋白样品为抗原, 兔免疫血清为一抗, HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗, 进行 Western blot 鉴定。结果表明, 重组质粒的诱导表达产物及纯化的 His-Myc 融合蛋白均在胶片上出现了分子质量约 55 ku 的单一一条带 (图 4), 说明笔者获得的山羊 Myc 多克隆抗体具有很强的特异性。

3 讨论

有关山羊 c-Myc 的原核表达及蛋白纯化本实验室曾有报道^[16], 但获得的 GST-Myc 融合蛋白纯度及含量无法满足多克隆抗体制备的需求。本研究对山羊 c-Myc 原癌基因原核表达和蛋白纯化技术

进行了改进, 获得了高纯度的 His-Myc 融合蛋白。作为融合蛋白表达的亲和纯化标签, 组氨酸 (6 × His) 标签 (0.84 ku) 与 GST 标签 (26 ku) 相比有许多优点。首先, 由于只有 6 个氨基酸, 分子质量很小, 在 pH 8.0 时, 不带电荷, 对蛋白质的表达、分泌、折叠、构象形成等影响小, 比较容易得到与天然蛋白相似的产物; 再次, 组氨酸标签无免疫原性, 重组蛋白无需切除标签而直接用作抗原来免疫动物, 也不影响后续的免疫学分析^[17]。鉴于上述原因, 本研究中改用了 6 × His 融合标签和具有温和启动子 trc 的 pSE380 表达载体, 而且在设计引物时, 在上游 5' 端加入 Nco I 酶切位点的同时, 加入了一段组氨酸 (6 × His) 标签序列, 以便使用金属螯合亲和层析法纯化重组蛋白。



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 未诱导的重组 BL21; 2~3. 用 1 mmol · L⁻¹ IPTG 37 °C 诱导的重组 BL21; 4~5. 纯化的 His-Myc 融合蛋白

M. Prestained protein marker; 1. Noninduced recombinant *E. coli* BL21; 2-3. Recombinant *E. coli* BL21 induced with 1 mmol · L⁻¹ IPTG at 37 °C; 4-5. Purified His-Myc fusion protein

图 4 山羊 c-Myc 多克隆抗体特异性检测

Fig. 4 Specificity detection of polyclonal anti-c-Myc antibody in *Capra Hircus*

Ni-NTA (Nickel-nitrilotriacetic acid) 琼脂糖是用于纯化 6 × His 标签重组蛋白的一种纯化介质, 它可用于在非变性或变性条件下纯化任何表达系统表达的 6 × His 标签重组蛋白。NTA 含有 4 个螯合区, 能更好的结合 Ni²⁺。6 × His 可与 Ni²⁺ 螯合, 从而使 His 标签蛋白结合在 Ni-NTA 纯化介质上, 未结合的蛋白被洗涤除去, 结合在介质上的蛋白经过一定浓度的咪唑或低 pH 缓冲液温和洗脱下来, 从而得到高纯度的目的蛋白^[17]。本研究经过少量诱导表达试验证明, His-Myc 融合蛋白系非可溶性表达, 因此选择了变性条件下的纯化方法。在变性条

件下,重组蛋白上的 $6 \times \text{His}$ 标签完全暴露出来,增强了重组蛋白与 Ni-NTA 的结合力,减少了非特异性蛋白的竞争性结合,增强了纯化效果,增加了重组蛋白的产量^[17]。纯化过程中,其它蛋白的富含组氨酸区域可能会非特异性地与 Ni^{2+} 结合,从而影响纯化效率。因蛋白是两性分子,其带电性质随 pH 的变化而变化,在洗脱时存在竞争结合;当杂蛋白洗脱液 pH 与目的蛋白 pH 接近时,杂蛋白容易洗脱,从而得到高纯的目的蛋白^[18]。*c-Myc* 蛋白的等电点 pH 为 7.8,笔者将菌体裂解液、杂蛋白洗脱液、目的蛋白洗涤液的 pH 分别调至为 8.0、6.3、4.5,有效的解决了这个问题。

4 结 论

本研究成功构建了山羊 *c-Myc* 原癌基因特异表达载体 pSE380-Myc,在 IPTG 诱导下,His-Myc 融合蛋白得以高效表达;在变性条件下纯化获得了高纯度 His-Myc 融合蛋白;以此融合蛋白为抗原免疫新西兰大白兔获得的多克隆抗体能与 His-Myc 融合蛋白特异性结合,表明山羊 *c-Myc* 多克隆抗体研制取得成功。本研究为山羊多能性干细胞自我更新机制的研究奠定了基础。

参考文献:

[1] 姜艳芳,谭 岩,赵平伟,等. *c-Myc* 基因在乳腺癌、膀胱癌和肾癌组织中的扩增研究[J]. 实用癌症杂志,2000,15(5):458-459.

[2] 北川知行. 早期癌的鉴别诊断与癌基因[J]. 国外医学(遗传学分册),1988,34(10):1216-1221.

[3] HAYASHI D. Study on the expression of oncogene mRNA in hepatocellular carcinoma using *in situ* hybridization technique [J]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 1994, 94: 814.

[4] FUHRMANN G, ROSENBERGER G, GRUSCH M, et al. The Myc dualism in growth and death[J]. *Mutat Res*, 1999, 437(3): 205-212.

[5] DEAN W, FELSHER J, MICHAEL B. Reversible tumorigenesis by Myc in hematopoietic lineages[J]. *Mol Cell*, 1999, 4: 199-207.

[6] DANG C V. C-myc target genes in involved in cell growth, apoptosis, and metabolism[J]. *Mol Cell Bi-*

ol, 1999, 19: 1-11.

- [7] YASUDA S Y, TSUNEYOSHI N, SUMI T, et al. NANOG maintains self-renewal of primate ES cells in the absence of a feeder layer[J]. *Genes Cells*, 2006, 11(9): 1115-1123.
- [8] LOH Y H, NQ J H, NQ H H. Molecular framework underlying pluripotency[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(7): 885-891.
- [9] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126: 663-676.
- [10] TAKAHASHI K, TANBE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131: 861-872.
- [11] LIU H, ZHU F, YONG J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts[J]. *Cell Stem Cells*, 2008, 3(5): 475-479.
- [12] WU Z, CHEN J J, REN J, et al. Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system[J]. *J Mol Cell Biol*, 2009, 1: 46-54.
- [13] ESTBAN M A, XU J, YANG J, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniture pig[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(26): 17634-17640.
- [14] HONDA A, HIROSE M, HATORI M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits-potential experimental models for human regenerative medicine [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 31362-31369.
- [15] BAO L, HE L, CHEN J, et al. Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug inducible expression of defined factors[J]. *Cell Res*, 2011, 21:600-608.
- [16] 赵 华,杨照海,刘 平,等.山羊 *c-Myc* 原癌基因克隆、原核表达和 GST-Myc 融合蛋白纯化[J]. 农业生物技术学报,2010,5(18):931-937.
- [17] A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins [M/OL]. [2003-07]. <http://www.mnstate.edu/provost/QiaExpressionist.pdf>.
- [18] 瞿礼嘉,顾礼雅,胡 苹,等.现代生物技术[M].第1版.北京:高等教育出版社,1997:64-66.

(编辑 郭云雁)